

Matej Kern
Student 3. godine Preddiplomskog studija kemije na Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu

Staudingerova reakcija

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka PMF-a

Mentor rada: Doc. dr. sc. Rosana Ribić, docent
Neposredni voditelj rada: Doc. dr. sc. Rosana Ribić, docent

Zagreb, 2016.

DATUM POLAGANJA I OCJENA ZAVRŠNOG ISPITA:

Mentor rada: Doc. dr. sc. Rosana Ribić

Potpis:

Predstojnik zavoda: prof. dr. sc. Hrvoj Vančik

Potpis:

Sadržaj

§ Sažetak.....	7
§ 1. Uvod	9
§ 2. Prikaz odabrane teme.....	10
2.1. Povijesni pregled.....	10
2.2. Reaktivnost azida i fosfina.....	11
2.2.1. Sinteza azida.....	11
2.2.2. Reakcije azida	11
2.2.3. Sinteza tercijarnih fosfina	12
2.2.4. Reaktivnost tercijarnih fosfina	12
2.3. Mehanizam Staudingerove reakcije.....	13
2.3.1. Mehanizam Staudingerove redukcije	13
2.3.2. Mehanizam Staudingerove ligacije	14
2.3.3. Mehanizam Staudingerove ligacije koja ne ostavlja trag	15
2.4. Sintetske primjene Staudingerove ligacije	16
2.4.1. Ligacija peptida	16
2.4.2. Ligacija glikopeptida.....	16
2.4.3. Modifikacije površina	17
2.4.4. Biomedicinske primjene	17
2.4.5. Sinteza polimera	18
2.5. Staudingerova reakcija kao metoda označavanja	19
2.5.1. Označavanje glikana	19
2.5.2. Označavanje proteina.....	19
2.5.2.1. Upotreba umjetnih aminokiselina	19
2.5.2.2. Protein-modificirajući enzimi.....	20
2.5.2.3. Profiliranje proteina na temelju aktivnosti.....	21
2.5.3. Označavanje lipida	21
2.5.3.1. Profiliranje N-miristoilacije i S-palmitoilacije	22
§ 3. Literaturna vrela.....	23

§ Sažetak

Staudingerova reakcija, adicija fosfina na azid, otkrivena je 1919. godine te je zajedno s hidrolizom nastalog iminofosforana služila kao način za redukciju azida u amine pri blagim uvjetima.

2000. godine Bertozzi i Saxon pronalaze novu upotrebu za Staudingerovu reakciju. Dodatkom elektrofilne zamke na fosfin nastali iminofosforan u reakciji s vodom daje amid koji zadržava skupinu na kojoj se nalazila elektrofilna zamka. Na taj je način omogućeno korištenje Staudingerove reakcije (sada Staudingerove ligacije) kao bio-ortogonalne metode konjugacije koja funkcionira pri fiziološkim uvjetima.

Od tada Staudingerova ligacija korištena je za obilježavanje glikana, lipida, DNA te proteina; razvijena je i varijanta ligacije koja ostavlja samo amidnu vezu između članova konjugacije. Staudingerova ligacija također je korištena kao sintetska metoda za stvaranje funkcionalnih biopolimera, glikopeptida itd.

Ovaj rad će ukratko prikazati dosadašnji razvoj Staudingerove reakcije te moguće buduće primjene.

§ 1. Uvod

Označavanje bioloških molekula unutar stanice predstavlja značajan problem zbog potrebe za funkcionalnim skupinama koje će reagirati međusobno no ne i s ostalim elektrofilima i nukleofilima prisutnim na proteinima, glikanima i drugim molekulama koje su prisutne u navedenoj okolini. Te funkcionalne skupine trebaju biti ne samo biološki ortogonalne po svojoj reaktivnosti već i međusobno selektivne.

Azidna skupina jedna je od rijetkih funkcionalnih skupina koja odgovara navedenim uvjetima.^[1] Unatoč visokoj reaktivnosti azida, azidna skupina reagira dajući stabilnu vezu s malom količinom funkcionalnih skupina. Također posjeduje prednost bivanja malom što znači da njeno uvođenje neće značajno promijeniti veličinu molekula na koje je vezana. Koristi se u nekoliko reakcija u svrhu biokonjugacije od kojih su najpoznatije bakar(I) katalizirana azid-alkin cikloadicija i Staudingerova reakcija.

Saxon i Bertozzi prepoznali su potencijal Staudingerove reakcije kao alata za biološki ortogonalno, selektivno označavanje molekula na polju glikobiologije te o tome izvjestili u radu 2000. godine.^[2] Nedugo za tim razvijena je i varijanta reakcije koja ostavlja samo amidnu vezu između spojenih fragmenata.^[3,4]

Ovaj rad ukratko će prikazati razvoj Staudingerove reakcije, njene današnje primjene i moguće primjene ubuduće.

§ 2. Prikaz odabrane teme

2.1. Povijesni pregled

Godine 1919. Herrman Staudinger i Jules Meyer izvijestili su u časopisu *Helvetica Chimica Acta* o do tada nepoznatoj reakciji organskih azida i tercijarnih fosfina.^[5] Produkti ove reakcije su aza-ilidi koji se u prisutnosti vode raspadaju na amid i fosfin oksid. Interes za njihov rad, kao i za fosfoazo spojeve, nije bio velik te je u slijedeća tri desetljeća objavljeno tek nekoliko radova na tu temu.

Tek nakon Kirsanovovog rada 1950. godine^[6] obnovio se interes za Staudingerovom reakcijom i ovom grupom spojeva te je Kabachnik et. al. pokazao 1956. da je moguće koristiti i estere fosforovih kiselina za pripravu fosfoazo spojeva.

Godine 2000. E. Saxon i C. R. Bertozzi izvijestile su o modificiranoj Staudingerovoj reakciji, sada zvanoj Staudingerova ligacija, koju su uspješno upotrijebile za modifikaciju glikokonjugata na staničnoj površini.^[2] Za razliku od reakcija koje su se do tada koristile za označavanje površine stanice^[8] reaktanti Staudingerove ligacije su bioortogonalni i vrlo selektivni te im zbog toga velik broj različitih funkcionalnih skupina koje se nalaze unutar stanica nije predstavljao problem. Da bi riješile problem hidrolize produkta Staudingerove reakcije autorice su modificirale fosfinski reagens dodatkom elektrofilne „zamke“ koja uzrokuje intramolekularnu ciklizaciju te daje stabilnu amidnu vezu.

Kasnije iste godine dvije grupe autora (Nilsson *et al.*^[3] i Saxon *et al.*^[4]) istovremeno su izvijestile o varijaciji Staudingerove ligacije koja ne ostavlja nikakav trag u nastaloj molekuli osim stvorene amidne veze. Fosfinski reaktant promjenjen je tako da je skupina, koju se željelo vezati amidnom vezom na azidni reaktant, na isti vezana tioesterskom vezom. Tokom reakcije dolazi do intramolekularnog preslagivanja imidofosforana u amidofosfonijsku sol koja hidrolizom daje amid.

2.2. Reaktivnost azida i fosfina

Obzirom na ključnost bioortogonalnosti u upotrebi Staudingerove ligacije za označavanje molekula *in vivo* bitno je opisati što bioortogonalnost je i kako ju reaktivnost azida i fosfina omogućuju. Termin bioortogonalna kemija skovala je 2003. godine C. R. Bertozzi, a odnosi se na reakcije koje se mogu odvijati u *in vivo* bez interakcije s ostalim prisutnim molekulama. Da bi reakcija bila bioortogonalna reaktanti moraju biti međusobno selektivni, ne smiju reagirati s ostalim prisutnim funkcionalnim skupinama, moraju davati stabilnu kemijsku vezu reagirajući dovoljno brzo da ne stigne doći do metabolizma i izlučivanja kemijske sonde. Zatim, niti jedan sudionik reakcije niti njezin produkt ne smije biti otrovan za sustav u kojem se odvija te barem jednu funkcionalnu skupinu koja sudjeluje u reakciji mora biti moguće uklopiti u ciljane molekule bez da utječe na njihovu aktivnost.

2.2.1. Sinteza azida

Sinteza organskih azida prvi je puta objavljena 1864. godine od autora Petera Grießa^[69] te od tada postoji skoro stalan interes za ovu klasu spojeva zbog njihove raznolike upotrebe u organskoj sintezi.^[70] Interes za azide bio je posebno vidljiv tokom 50-ih i 60-ih godina^[71] te također zbog njihove upotrebe u liječenju AIDS-a.^[72] Obzirom na postojanje mnogih načina sinteze organskih azida ovdje će biti spomenute samo par, u kontekstu rada, najzanimljivijih.

Često korišten pristup sintezi organskih azida, koji je moguće provesti kako kod aromatskih^[73] tako i kod alifatskih spojeva,^[74] jest diazo transfer reakcija. Tokom te reakcije amin reagira s izvorom azidne skupine u prisutnosti bakra(II) te prelazi u azid. Blagi reakcijski uvjeti te visoka iskorištenja koja odlikuju ovu reakciju razlog su njene česte primjene.

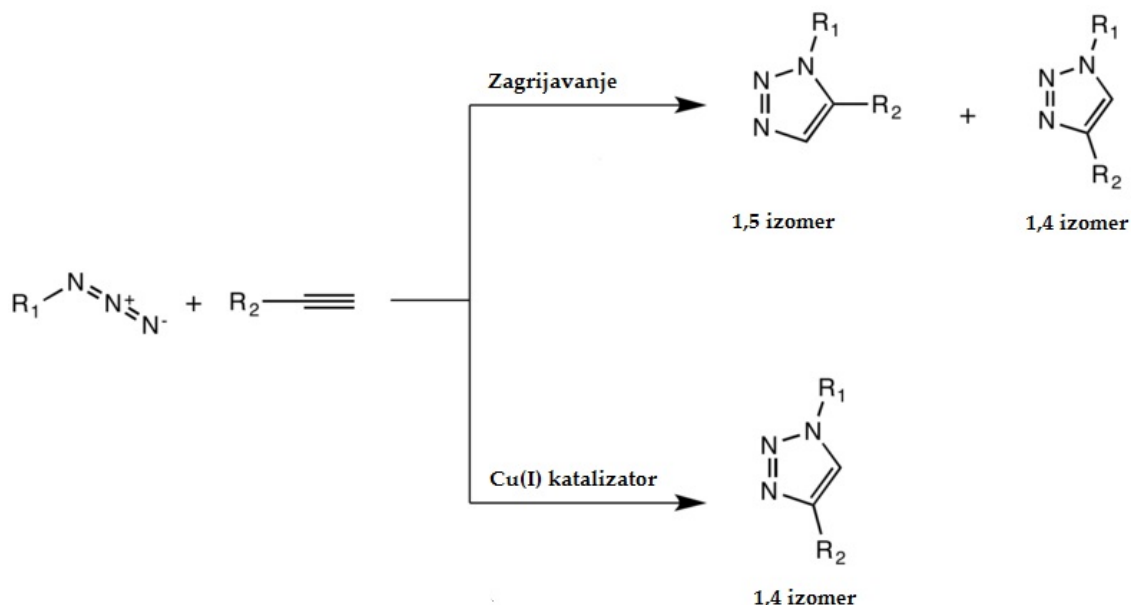
Organski se azidi također lako daju dobiti nukleofilnom substitucijom. Najčešće korišten izvor azidne skupine je natrijev azid makar se koriste i drugi izvori kao što su tetraalkilamonijev azid i polimerni azidi.^[75] Za izlazne skupine često se koriste halidi,^[76] karboksilati i mesilati.^[7] Ovaj pristup nudi mnoštvo mogućnosti u izboru sintetskog puta.

2.2.2. Reakcije azida

Azidi, obzirom na njihovu strukturu i raspodjelu naboja, mogu reagirati na razne načine obzirom na uvjete u kojima se nalaze. Uglavnom je slučaj da reagiraju s nukleofilima na trećem (najdaljem) dušikovom atomu dok elektrofil pretežito reagiraju s prvim (ostatku molekule najbližim) dušikovim atomom. Čest je slučaj da tokom reakcija azida dolazi do pucanja dušik – dušik veze uz oslobađanje molekule dušika.

Jedna od poznatih reakcija azida, osim Staudingerove reakcije, jest termalna cikloadicija na alkine. Tokom te reakcije dolazi do stvaranja peteročlanog prstena koji se sastoji od sva tri atoma dušika i oba ugljika iz alkina. Također postoji varijanta reakcije koja koristi bakar kao katalizator (shema 1).

Koristeći svjetlo ili povišenu temperaturu kao način aktivacije, azide je također moguće koristiti za cikloadicije koje idu preko nitrenskog međuprodukta.^[77] Nitrenski međuprodukt moguće je također koristiti za umetanje dušika u postojeće C – H veze.



Shema 1. Cikloadicija azida na alkine

2.2.3. Sinteza tercijarnih fosfina

Otkako su prvi put sintetizirani 1845. godine^[10] nađeni su i korišteni mnogi sintetski putevi za pripremu fosfina. Moguće ih je sintetizirati grijući smjesu alikilnih jodida, fosfonijevog jodida i cinkovog oksida do temperatura između 100 i 180 stupnjeva Celzijusovih. Pripravljani su reakcijom metalnih fosfida s alkilnim halogenidima i na mnoge druge načine.

Trifenilfosfin, član ove skupine spojeva kojeg se najviše priredi godišnje, sintetizira se reakcijom fosforovog (III) klorida, klorbenzena i natrija.^[9] Ullmannova enciklopedija industrijske kemije također navodi da je često korišten sintetski put radikalna adicija alkena na fosfin.

2.2.4. Reaktivnost tercijarnih fosfina

Fosfini ($R''R'R'P$) su reaktivna skupina spojeva fosfora u oksidacijskom stanju +3. Lako vežu kisik bilo iz zraka bilo iz drugih spojeva dajući fosfinske okside. Također lako vežu sumpor te halogene elemente. U prisustvu jakih kiselina tercijarni fosfini adiraju se na nezasićene estere i aldehide; s kloraminom reagiraju dajući amino – substituirane fosfonijeve katione.

Aromatski tercijarni fosfini su relativno stabilna skupina fosfina. Za razliku od alifatskih fosfina otporniji su na oksidaciju te sporo oksidiraju u prisutnosti kisika. Iako je većina fosfina nukleofilna zbog elektronskog para na fosforu njihova svojstva u velikoj mjeri ovise o, te se također daju regulirati, skupinama koje su vezane na aromatske jezgre vezane na fosfor^[10,11,12] i upravo ih je zbog toga moguće koristiti kao bioortogonalne kemijske sonde.

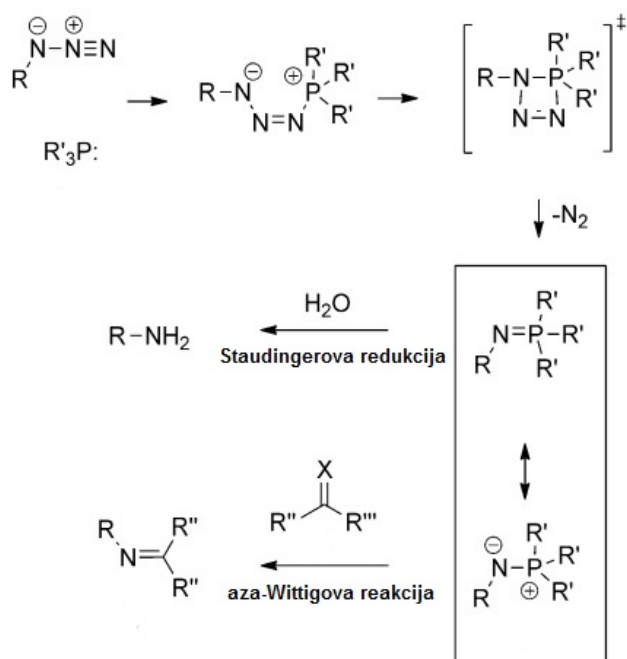
2.3. Mehanizam Staudingerove reakcije

2.3.1. Mehanizam Staudingerove redukcije

Tokom Staudingerove redukcije dolazi do nukleofilne adicije fosfina na terminalni dušikov atom azidne skupine dajući fosfoazidnu prijelaznu strukturu (shema 2). Sljedeći je korak intramolekularna ciklizacija u kojoj nastaje četveročlani prsten koji čine tri dušikova atoma iz azidne skupine i atom fosfora. Raspadom nastalog prstena nastaju molekula dušika i iminofosforan koji se prikazuje rezonantnim strukturama. Dodatkom vode dolazi do hidrolize iminofosforana na amin i stabilni fosfin oksid. Mehanizam Staudingerove redukcije temeljito je istražen kako eksperimentalnim^[11,12] tako i komputacijskim metodama.^[13,14]

Kinetika Staudingerove redukcije može biti prvog ili drugog reda obzirom na to da li je najsporiji korak unimolekularni raspad cikličkog prijelaznog stanja ili bimolekularna formacija fosfoazida.

Druga, slična reakcija koja polazi od iminofosforana je aza-Wittigova reakcija, o kojoj su prvo izvjestili Staudinger i Hauser^[14], a koja koristi aldehid, keton ili tioketon kao prekursor za sintezu imina.

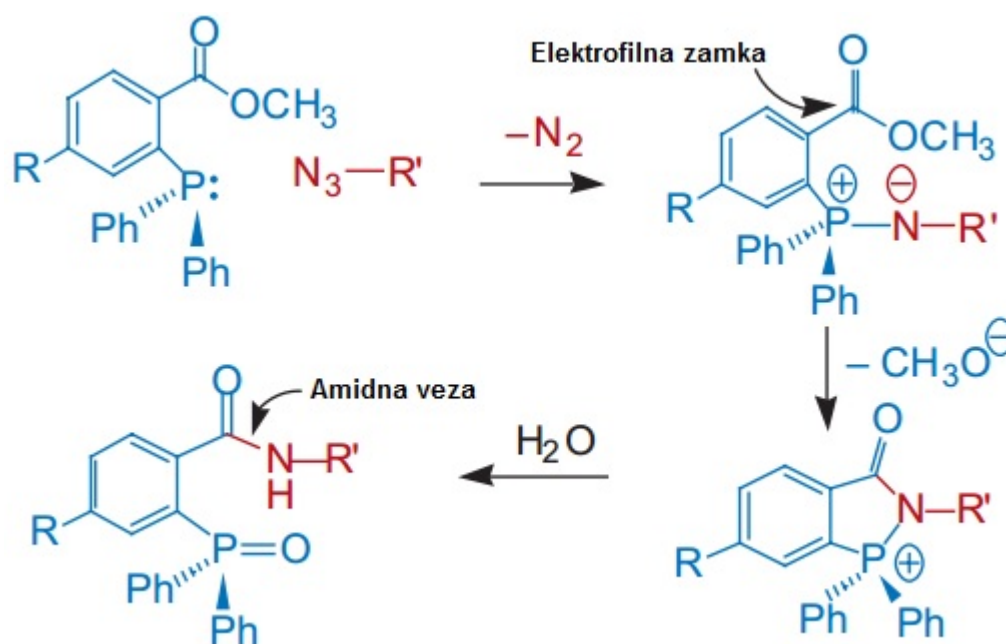


Shema 2. Mehanizam Staudingerove redukcije

2.3.2. Mehanizam Staudingerove ligacije

Kako bi izbjegli hidrolizu iminofosforana u prisutnosti vode Bertozzi i Saxon koristili su fosfinski reagens tako promjenjen da je sadržavao elektrofilnu „zamku“ u obliku metilnog estera na položaju prikladnom za intramolekularnu ciklizaciju s atomom dušika u iminofosforanu. Dodatkom vode dolazi do cjepanja nastalog prstena prilikom kojeg puca veza dušika i fosfora ostavljajući strukturu s amidnom vezom.

Iako su postojale sumnje da se reakcija odvija na način da kisik iz karboksilne skupine tvori dvostruki prsten vežući se na fosfor kasnija istraživanja predložila su mehanizam vidljiv na shemi 3.^[17]

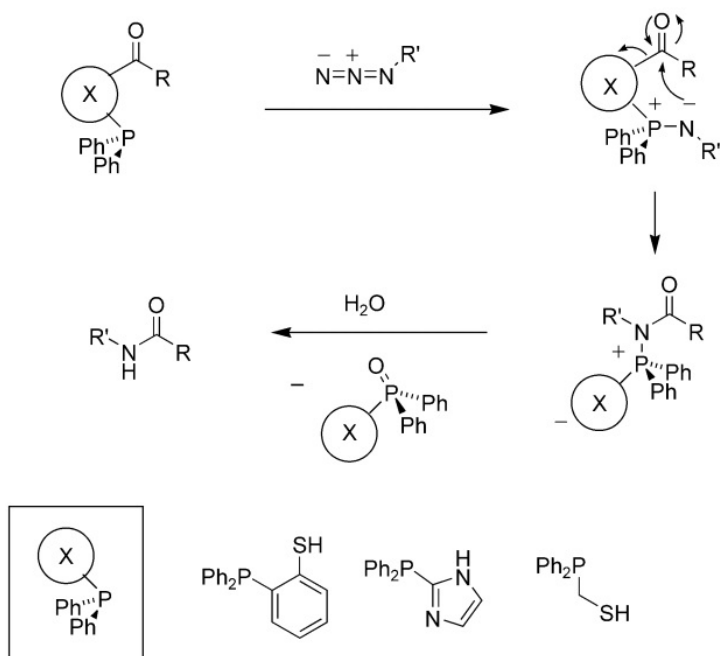


Shema 3. Mehanizam Staudingerove ligacije

2.3.3. Mehanizam Staudingerove ligacije koja ne ostavlja trag

Kasnije te godine dvije skupine autora^[3,4] izvjestili su o modifikaciji Staudingerove ligacije koja po dodatku vode u ciljanoj molekuli ostavlja samo amidnu vezu (shema 4). Za ovu vrstu Staudingerove ligacije fosfinski reagens bio je vezan na jednu od ciljnih molekula tioesterskom vezom te bi nastali iminofosforan također prolazio intramolekularno preslagivanje ovaj put dajući amidofosfonijsku sol. Navedena sol dodatkom vode hidrolizira ostavljajući samo amidnu vezu između spojenih molekula.

Mehanizam i kinetika ove vrste Staudingerove ligacije također je istražena^[16] te je nađeno da je reakcija drugog reda i da je (difenilfosfino)metantiole reagens s najvišom konstantom brzine reakcije i najboljom selektivnosti.



Shema 4. Mehanizam Staudingerove ligacije koja ne ostavlja trag

2.4. Sintetske primjene Staudingerove ligacije

2.4.1. Ligacija peptida

Nativna kemijska ligacija izvrstan je primjer visoko selektivne reakcije za izgradnju polipeptida. Otkrivena 1953. godine od strane Weiland *et al.*^[18] te koju su dalje razvili Kent i suradnici^[19] nativna kemijska ligacija omogućuje spajanje dva nezaštićena peptidna fragmenta dajući jedan produkt s visokim iskorištenjem. Ligacija se bazira na reakciji C-terminalnog tioestera jednog fragmenta i N-terminalnog cisteinskog ostatka drugog peptidnog fragmenta. Ovaj zahtjev za postojanjem cisteinskog ostatka na mjestu spoja zajedno s činjenicom da je sinteza polipeptida trenutno ograničena na izradu istih s do 50 ostataka^[20] bile su inspiracija Raines i suradnicima da prikažu potencijal Staudingerove ligacije da omogući sintezu dugih polipeptidnih fragmenata.^[20] Koristeći ortogonalne metode kemijske ligacije Raines i suradnici napravili su totalnu sintezu ribonukleaze A iz tri fragmenta.^[21]

Koristeći (difenilfosfino)metantiolel varijanta Staudingerove ligacije koja ne ostavlja trag davala bi visoka iskorištenja samo kada bi se na mjestu spoja nalazio glicin. To ograničenje zaobišli su Raines i suradnici koristeći fosfinske reagense kojima je, putem supstituenta na fenilnim skupinama, pravilno podešena elektronska gustoća oko atoma fosfora.^[22]

Nedavno je Staudingerova ligacija korištena za spajanje mnogih drukčijih fragmenata kao što su ciklizacije u kojima nastaju laktami (Masson *et al.*^[23]), vezanje peptidnih fragmenata na porfirinske prstene koji sadrže azidnu skupinu (Umezawa *et al.*^[24]) te vezanje glikopeptidnih fragmenata na peptidne fragmente (Liu *et al.*^[25]).

2.4.2. Ligacija glikopeptida

Obzirom na velik značaj glikopeptida i glikoproteina u biološkim sustavima bilo je potrebno naći efikasan način spajanja glikosilnih fragmenata na aminokiseline. Trokomponentnu Staudingerovu ligaciju za izradu N-spojenih glikoamino kiselina predstavili su Doores *et al.*^[26] Temeljem te varijante Staudingerove ligacije istraživačke skupine Davis-a i Green-a pripremile su ugljične nanocijevi jednostrukih zidova obilježene ugljikohidratima (glikol-SWNT).^[27]

Trokomponentna Staudingerova ligacija također je rabljena od strane Lindhorsta i suradnika da bi pristupili N-manoziloksietil- i N-glikoziloktanamid- amino kiselinama te trivalentnim glikoklaster aminokiselinama.^[28] Ligacija amino kiselina na nezaštićene α - i β -glikozidaze istražena je od strane Nisic *et al.*^[29] koristeći florirane estere fosfina. 2-(difenilfosfino)-5-florofenol prvo je vezan na karboksilnu skupinu α ili β amino kiselina te je dobivena molekula korištena u Staudingerovoj ligaciji s nezaštićenim α ili β glikozidazama da bi se dobile glikozil amino kiseline pri dobrim iskorištenjima.

2.4.3. Modifikacije površina

Imobilizacija proteina i peptida na određenim mjestima površine tema je mnogih publikacija zadnjih godina^[30] te ne čudi da je Staudingerova ligacija često korištena metoda za postizanje tog cilja. Prvi primjer korištenja Staudingerove ligacije za modifikaciju površine istovremeno je prenesen u publikacijama Soellner *et al.*^[31] i Köhn *et al.*^[32] Njihova izvješća o modifikaciji staklene površine ubrzo je slijedilo izvješće o modifikaciji površine zlata – Kalia *et al.* vezali su RNazu A na površinu koja je sadržavala fosfinotioesterske skupine.^[33]

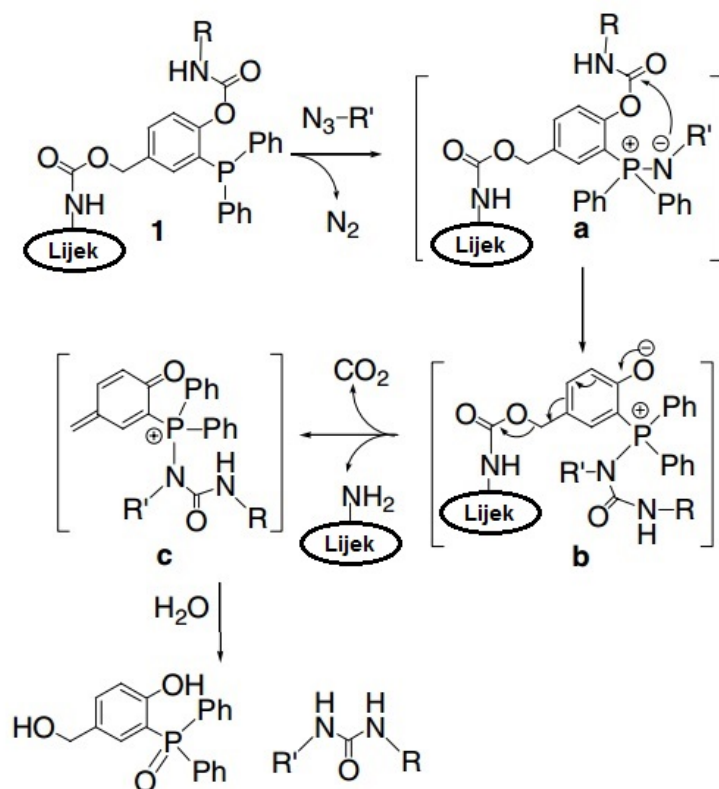
Izvjешteno je također o upotrebi dendrimera za fiksaciju fosfinskih skupina na staklenu površinu kako bi se omogućila Staudingerova ligacija s azidom označenim Ras proteinom.^[34] Gauchet *et al.* izvjestio je o regio- i kemo- selektivnoj imobilizaciji proteina na staklene površine koristeći metode post-translacijske modifikacije proteina i fosfinski modificirane fiksacije na površinu.^[35]

Nedavno je opisan način izrade površina za imobilizaciju funkcionalnih molekula na azidne skupine bez prisustva bakra.^[36] Premaz pogodan za daljnju modifikaciju dobiven je termalnim umrežavanjem polimera koji sadrže azidne skupine zajedno s adekvatnim poprečnim povezivačima.

2.4.4. Biomedicinske primjene

Jedna od mogućih biomedicinskih primjena staudingerove ligacije je izazivanje otpuštanja lijekova. Azoulay *et al.* su za tu svrhu napravili fosfinsku „sondu“ čija se elektrofilna zamka ponašala kao sustav za oslobađanje lijeka (shema 5).^[37] 4-nitroanilin i doksorubicin su korišteni kao primjeri lijekova u navedenoj publikaciji.

Također je moguća kemoselektivna funkcionalizacija površina liposoma koristeći Staudingerovu ligaciju. Glikoliposom pogodan za vezanje lektina dobiven je reakcijom, pri biološki kompatibilnim uvjetima, azidolaktoze i liposoma čija je površina bila označena fosfinom.^[38] Postignuta je i modifikacija pokrovnih proteina kapside virusa.^[39] Ugradnjom aminokiseline *p*-azidofenilalanin na točno određeno mjesto pokrovnog proteina Z domene faga omogućilo je označavanje fosfinskim reagenom na koji je bio vezan fluorescein.



Shema 5. Mehanizam otpuštanja lijekova

2.4.5. Sinteza polimera

Staudingerova ligacija korištena je 2009. godine i u sintezi modificiranog alginata. Korišteni su heterobifunkcionalan polietilen glikol i karbodiimid za vezanje azidne skupine na alginat te je provedena Staudingerova ligacija dodatkom polietilen glikolnih lanaca, koji su završavali s 1-metil-2-difenilfosfino-tereftalatom, što je rezultiralo spontanom stvaranjem gelova.^[40] Alginat na koji su vezane azidne skupine, ali bez dodatka fosfinskog reagensa, zadržao je sposobnost tvorenja hidrogelova elektrostatskim interakcijama s viševalentnim kationima kao što su Ba²⁺ i Ca²⁺.

Također, putem Staudingerove ligacije, sintetiziran je polimer koji u prisutnosti različitih plinova (CO₂ i N₂) prelazi iz nenabijene forme u formu s nabojem i natrag.^[41] Radilo se o kopolimeru polistirena i poli(*p*-azidometilstirena) na koji je Staudingerovom ligacijom dodana amidinska skupina. Pokazalo se da je Staudingerova ligacija najprikladnija metoda za uvođenje amidinske skupine na navedeni kopolimer.

2.5. Staudingerova reakcija kao metoda označavanja

2.5.1. Označavanje glikana

Snimanje glikana može se raditi pomoću lektina ili antitijela, no njihova upotreba *in vivo* je ograničena zbog njihovog niskog afiniteta. Metode koje se rabe za oslikavanje DNA i proteina nisu upotrebljive na glikanima kako oni nisu izravno kodirani genomom. Još jedan pristup snimanju glikana jest formacija Schiffovih baza s aldehidima ili ketonima, no ta tehnika također nailazi na teškoće *in vivo* zbog velike dostupnosti metabolita s tim funkcionalnim skupinama.

2000. godine Saxon i Bertozzi uspješno su primjenili *N*-azidoacetilmanozamin (derivat manoze) kao bioortogonalni reporter koji se ugrađuje u novosintetizirane glikane i omogućuje njihovo označavanje biotinom supstituiranim fosfinskim sondama.^[2] Biotinske sonde omogućuju vizualizaciju označenih glikana dodatkom fluoresceinom označenog avidina. Zbog malog postotka ugradnje drugih derivata ManNAc u sialičnu kiselinu Bertozzi i suradnici istražili su direktnog mogućnost uvođenja modificirane sialične kiseline za koju se pokazalo da je vezana na površinu stanica.^[42]

U svrhu vizualizacije glikana i ostalih biomolekula tokom njihove funkcije u živim sustavima razvijani su fluorescirajući fosfinski reagensi sposobni Staudingerovom ligacijom vrlo selektivno označiti prethodno azidošećerima metabolički označene molekule. Chang *et al.* 2007. godine izvješćuje o upotrebi Cy5.5-fosfinskom reagensu koji apsorbira i emitira NIR svjetlo te njegovoj usporedbi s fluorescein- i rodamin-supstituiranim fosfinskim reagensima pri označavanju glikana na površini stanica jajnika kineskog hrčka Staudingerovom ligacijom.^[43]

Osim navedenih metoda Bertozzi i suradnici su prikazali i metodu koja označava prisustvo glikana na površini stanica koristeći bioluminiscenciju.^[44] Prilikom Staudingerove ligacije luciferinom substituiranog fosfinskog reagensa s označenim glikanom dolazi do oslobađanja luciferina koji potom difundira u stanicu gdje biva pretvoren u bioluminiscentni oksiluciferin.

2.5.2. Označavanje proteina

Prilikom označavanja proteina radi se uvođenje jedne od funkcionalnih skupina koja je potrebna za Staudingerovu ligaciju. Azidna skupina je preferabilna obzirom na njenu veću stabilnost pri fiziološkim uvjetima od fosfina. Ona može biti uvedena genetskim inženjeringom^[46], ugradnjom aminokiselina koje ju sadrže, diazotransfer reakcijom^[45] ili posttranslacijskom modifikacijom proteina.

2.5.2.1. Upotreba umjetnih aminokiselina

Umetanje umjetnih aminokiselina u proteine izvršava se na jedan od dva načina. Prvi od njih jest iskorištavanje nonsense kodona na način da se za isti napravi ortogonalna *t*RNA, umjetna aminokiselina te umjetna aminoacil- *t*RNA sintetaza koja ih vrlo selektivno spaja.

Ovu metodu razvili su Schultz i suradnici^[47] te se njome raznovrsne aminokiseline mogu umetnuti u proteine koristeći stanice kvasca, sisavaca ili *E. coli*.^[48] Nekoliko grupa autora koristilo je ovu metodu označavanja proteina kao predkorak Staudingerove ligacije.^[39,49,50]

Drugi od načina jest supstitucija standardne aminokiseline strukturno joj sličnom umjetnom aminokiselinom. To se postiže uzgojem auktotrofnih stanica u mediju koji sadrži umjetnu aminokiselinu, a osiromašen je sadržajem aminokiseline koju želimo zamijeniti. Uspješnost ove metode ovisi vrlo jako o strukturnoj sličnosti umjetne i zamjenjene aminokiseline obzirom da aminoacil-*t*RNA sintetaze vrše strogu kontrolu nad primljenom aminokiselinom koju vežu na *t*RNA. Primjer upotrebe ove metode je ekspresija proteina s umjetnim aminokiselinama u metionin-auksotrofnom soju *E. coli* u mediju obogaćenom azidohomoalaninom ili azidoalaninom.^[51] Uklapanje korištenih umjetnih aminokiselina prvo je ispitano računalnom simulacijom te je potom proveden eksperiment u kojem je, u opisanim uvjetima, sintetizirana azidohomoalaninom substituirana murin dihidrofolat reduktaza. Analiza aminokiselinskog sadržaja indicirala je $95 \pm 2\%$ zamjenu metionina azidohomoalaninom te je na dobivenom proteinu uspješno provedena Staudingerova ligacija s FLAG supstituiranim fosfinskim reagensom (FLAG je hidrofilni oktapeptid sastava AspTyrLysAspAspAspLys). Staudingerova ligacija također je uspješno provedena i na neobrađenom lizatu stanica što sugerira da bi se ova metoda mogla koristiti i za unutarstanično označavanje.

Metode koje su ovdje opisane zahtjevaju još jedan korak poslje Staudingerove ligacije za vizualizaciju ciljane molekule što bi se moglo izbjeći izradom fluorescirajućeg kumarinom supstituiranog fosfinskog reagensa. Prednost takvog reagensa jest činjenica da počinje biti fluorescentan tek nakon oksidacije atoma fosfora tokom Staudingerove ligacije^[52] (prilikom oksidacije atoma fosfora primjećeno je šezdeseterostruko povećanje fluorescencije), no također je primjećena i prisutnost nespecifične oksidacije fosfinskog reagensa u kontaktu s zrakom. Da bi se zaobišao taj problem razvijen je fosfinski reagens čija elektrofilna zamka sadrži skupinu koja omogućuje rezonancijsko gašenje fluorescencije dok je prisutna.^[53] Prilikom Staudingerove reakcije dio elektrofilne zamke se odcjepljuje te time omogućuje fluorescenciju ostatka, sada vezanog, fosfinskog reagensa. Razvijeni fosfinski reagens pokazao se toliko uspješnim da su ga autori iskoristili za označavanje stanične površine živućih HeLa stanica te su također utvrdili da reagens nije citotoksičan te može biti rabljen u *in vivo* studijama.

2.5.2.2. Protein-modificirajući enzimi

Sljedeći način označavanja proteina putem Staudingerove ligacije koristi post-translacijsku modifikaciju proteina enzimima koji prepoznaju određeni slijed aminokiselina. Primjer ove metode je ligacija azidom substituiranog analoga biotina na ljudsku p67 biotin primajuću domenu koristeći biotin ligazu organizma *Pyrococcus horikoshii*.^[54] Dobiveni adukt podvrgnut je Staudingerovoj ligaciji s FLAG substituiranim fosfinskim reagenskom te detektiran imunoblottingom s anti-FLAG antitijelima.

2.5.2.3. Profiliranje proteina na temelju aktivnosti

Sonde bazirane na reakcijskom mehanizmu izuzetno su važno oruđe za određivanje enzimatske aktivnosti proteinskih familija u kompleksnim proteomima te se mogu koristiti za karakterizaciju inhibitora koji su male molekule. Takve sonde generalno se sastoje od reaktivne skupine za povezivanje na protein i strukture za afinitetno vezanje. Ipak, takve sonde trebaju sadržavati i dio koji je moguće otkriti kako bi se odredila iskoristivost označavanja koristeći ih. Azidna skupina omogućuje otkrivanje sondi baziranih na reakcijskom mehanizmu putem Staudingerove ligacije s fluorescentnim fosfinskim reagensom ili fosfinskim reagensom koji sadrži afinitetne oznake.^[55] Koristeći ovu metodurazvijeno je nekoliko inhibitora za glikozidaze,^[56] proteaze^[57] i cistein proteaze.^[58]

Druga metoda označavanja proteina na temelju njihove aktivnosti je fotoafinitetno označavanje i zasniva se na identifikaciji ciljnih proteina i razjašnjenju njihovih veznih mjesta pomoću kovalentnog vezanja svjetlom povezuje funkcionalne skupine. Često su u ovu svrhu radioizotopi bili vezani na fotoreaktivne funkcionalne skupine no Hosoya *et al.* su predstavili sondu koja izbjegava njihovo korištenje.^[59] Sonda sadrži azido-benzilazidni dio koj omogućuje fotoreaktivno vezanje na protein te potom Staudingerovu ligaciju s fluorescentnim fosfinskim reagensom. Koristeći taj tip sonde istraženo je vezanje cerivastatina na ljudsku 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktazu. Također je pokazano da uspješnost označavanja proteina ovom metodom ne ovisi o načinu ligacije djela sonde koji povećava vidljivost ili omogućuje odvajanje ciljnog proteina već o strukturi za afinitetno vezanje na isti.^[60]

Označavanje proteina na temelju njihove aktivnosti nažalost ima i određene nedostatke kao što je mogućnost da se izgubi informacija o strukturi ciljnog proteina u denaturirajućim uvjetima SDS-PAGE elektroforeze. Nekovalentno označavanje proteina na temelju njihove aktivnosti rješava taj nedostatak. Wanger i suradnici kompleksirali su azido-novobiocin s GyrB podjedinicom DNA giraze te su u slijedećem koraku označili nastali kompleks rodaminom substituiranim fosfinskim reagensom koristeću Staudingerovu ligaciju.^[61] Tako označen kompleks identificiran je pri nedenaturirajućim uvjetima iz staničnog lizata.

Staudingerova ligacija također je korištena kao dio metode označavanja proteina u svrhu praćenja prometa limfocita. Tanaka i suradnici koristili su Staudingerovu ligaciju koju je slijedila aza-elektrociklizacija da bi označila HSA protein.^[62] Tako označene stanice gliome uspješno su vizualizirane nakon inkubacije s rodaminskom sondom.

Postoje također primjeri modifikacije cijele površine stanice kao u slučaju Langheransovih otočića gušterače koji često bivaju napadnuti proteinima iz krvi u slučaju pacijenata diabetesa tipa 1 rezultirajući upalnom reakcijom. Chaikof i suradnici izvjestili su o pristupu rješavanja tog problema modifikacijom površine otočića koristeći Staudingerovu ligaciju kao dio metode spajanja trombomodulina.^[63] Na taj način obrađeni Langheransovi otočići pokazivali su smanjenu reakciju imunostava.

2.5.3. Označavanje lipida

Budući da su sekundarni metaboliti, lipidi se ne mogu proučavati direktnom upotrebom genetski kodiranih izvjestitelja. Kao i u slučaju glikana istraživanju lipida značajno koristi

moćnost inkorporacije bio-ortogonalnih oznaka u iste. Označavanje lipida također koristi razotkrivanju funkcije i ponašanja proteolipida. Lipidacija istih generalno se događa tokom ili nakon translacije te je u većini slučajeva S-palmitoilacija, N-miristoilacija ili prenilacija. Kod eukariota vezanje zasićenih masnih kiselina na proteine pospješuje interakciju istih s membranama ili drugim proteinima.

2.5.3.1. Profiliranje N-miristoilacije i S-palmitoilacije

N-miristoilacija N-terminalnog glicina i S-palmitoilacija cisteina igraju važne uloge u više bioloških procesa kao što su diferencijacija stanica, apoptoza te stvaranje tumora.^[64] Za istraživanje ovih procesa koristile su se radioizotopima označene masne kiseline no ta metoda uključuje duga vremena ekspozicije te upotrebu opasnih, visokoenergetskih, radioizotopa.^[65]

Ploegh i suradnici su izvijestili o paru ω -azido masnih kiselina koje se uspješno metabolički uklapaju u stanicama sisavaca te služe kao selektivne sonde za vizualizaciju N-miristoilacije i S-palmitoilacije.^[66] Nakon *in vitro* lipidacije azidne skupine iskorištene su kao vezno mjesto biotinom substituiranog fosfinskog reagensa u Staudingerovoj ligaciji. Ova metoda korištena je za istraživanje S-palmitoilacije mitohondrijskih proteina i N-miristoilacije proteina tokom apoptoze.^[67,68] Kasnije, radom Tate-a i suradnika, razvijen je općenit postupak za označavanje rekombinantnih proteina na temelju ove metode. Njihov pristup bio je koeksprimirati N-miristoil transferazu i rekombinantni proteinu stanicama *E. coli* što bi slijedilo kotranslacijsko označavanje analogom miristinske kiseline.

§ 3. Literaturna vrela

- [1] H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **34** (2001) 727 – 736.
- [2] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **287** (2000) 2007 – 2010.
- [3] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2** (2000) 1939 – 1941.
- [4] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2** (2000) 2141 – 2143.
- [5] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **2** (1919) 635.
- [6] A. V. Kirsanov, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Otd. Khim. Nauk* (1950) 426.
- [7] A. P. S. Bara, A. L. Zografos, D. O'Malley, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 3726 – 3727.
- [8] L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **276** (1997) 1125 – 1128.
- [9] Svava, Jürgen; Weferling, Norbert & Hofmann, Thomas, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Phosphorus Compounds, Organic*, Wiley-VCH, Weinheim 2006.
- [10] D. E. C. Corbridge, *Phosphorus: an outline of its chemistry, biochemistry, and uses*, Elsevier, Amsterdam 1995.
- [11] Y. G. Gololobov, L. N. Zhmurova, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **37** (1981) 437 – 472.
- [12] Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **48** (1992) 1353 – 1406.
- [13] W. Q. Tian, Y. A. Wang, *J. Chem. Theory Comput.* **1** (2005) 353 – 362.
- [14] C. Widauer, H. Grützmacher, I. Shevchenko, V. Gramlich, *Eur. J. Inorg. Chem.* (1999) 1659 – 1664.
- [15] H. Staudinger, E. Hauser, *Helv. Chim. Acta* **4** (1921) 861 – 886.
- [16] M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 8820 – 8828.
- [17] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 2686 – 2695.
- [18] T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Liebigs Ann. Chem.* **583** (1953) 129 – 149.
- [19] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clarklewis, S. B. H. Kent, *Science* **266** (1994) 776 – 779.
- [20] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **3** (2001) 9 – 12.
- [21] B. L. Nilsson, R. J. Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 5268 – 5269.
- [22] M. B. Soellner, A. Tam, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **71** (2006) 9824 – 9830.
- [23] G. Masson, T. den Hartog, H. E. Schoemaker, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen, *Synlett* (2006) 865 – 868.
- [24] N. Umezawa, N. Matsumoto, S. Iwama, N. Kato, T. Higuchi, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 6340 – 6350.
- [25] L. Liu, Z. Y. Hong, C. H. Wong, *ChemBioChem* **7** (2006) 429 – 432.
- [26] K. J. Doores, Y. Mimura, R. A. Dwek, P. M. Rudd, T. Elliott, B. G. Davis, *Chem. Commun.* (2006) 1401 – 1403.
- [27] S. Y. Hong, G. Tobias, B. Ballesteros, F. El Oualid, J. C. Errey, K.J. Doores, A. I. Kirkland, P. D. Nellist, M. L. H. Green, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 10966 – 10967.
- [28] A. Schierholt, H. A. Shaikh, J. Schmidt-Lassen, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* (2009) 3783 – 3789.
- [29] F. Nisic, M. Andreini, A. Bernardi, *Eur. J. Org. Chem.* (2009) 5744 – 5751.
- [30] P.-C. Lin, D. Weinrich, H. Waldmann, *Macromol. Chem. Phys.* **211** (2010) 136 – 144.

- [31] M. B. Soellner, K. A. Dickson, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 11790 – 11791.
- [32] M. Kçhn, R. Wacker, C. Peters, H. Schrçder, L. Soulere, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **115** (2003) 6010 – 6014; *Angew. Chem. Int. Ed.* **42** (2003) 5830 – 5834.
- [33] J. Kalia, N. L. Abbott, R. T. Raines, *Bioconjugate Chem.* **18** (2007) 1064 – 1069.
- [34] A. Watzke, M. Kçhn, M. Gutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schrçder, R. Breinbauer, J. Kuhlman, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **118** (2006) 1436 – 1440; *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006) 1408 – 1412.
- [35] C. Gauchet, G. R. Labadie, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 9274 – 9275.
- [36] L. A. Canalle, S. S. van Berkel, L. T. de Haan, J. C. M. van Hest, *Adv. Funct. Mater.* **19** (2009) 3464 – 3470.
- [37] M. Azoulay, G. Tuffin, W. Sallem, J. C. Florent, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 3147 – 3149.
- [38] H. Zhang, Y. Ma, X.-L. Sun, *Chem. Commun.* (2009) 3032 – 3034.
- [39] M.-L. Tsao, F. Tian, P. G. Schultz, *ChemBioChem* **6** (2005) 2147 – 2149.
- [40] K. M. Gattás-Asfura, C. L. Stabler, *Biomacromolecules* **10** (2009) 3122 – 3129.
- [41] K. Zhou, J. Li, Y. Lu, G. Zhang, Z. Xie, C. Wu, *Macromolecules* **42** (2009) 7146 – 7154.
- [42] S. J. Luchansky, S. Goon, C. R. Bertozzi, *ChemBioChem* **5** (2004) 371 – 374.
- [43] P. V. Chang, J. A. Prescher, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 8400 – 8401.
- [44] A. S. Cohen, E. A. Dubikovskaya, J. S. Rush, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 8563 – 8565.
- [45] a) S. F. M. van Dongen, R. L. M. Teeuwen, M. Nallani, S. S. van Berkel, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, J. C. M. van Hest, *Bioconjugate Chem.* **20** (2009) 20 – 23; b) S. Schoffelen, M. B. van Eldijk, B. Rooijackers, R. Raijmakers, A. J. R. Heck, J. C. M. van Hest, *Chem. Sci.* **2** (2011) 701 – 705.
- [46] A. J. de Graaf, M. Kooijman, W. E. Hennink, E. Mastrobattista, *Bioconjugate Chem.* **20** (2009) 1282 – 1295.
- [47] C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science* **244** (1989) 182 – 188.
- [48] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **79** (2010) 413 – 444.
- [49] V. Bçhrsch, R. Serwa, P. Majkut, E. Krause, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Commun.* **46** (2010) 3176 – 3178.
- [50] T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, T. Kobayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Chem. Biol.* **15** (2008) 1187 – 1197.
- [51] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (2002) 19 – 24.
- [52] G. A. Lemieux, C. L. de Graffenried, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 4708 – 4709.
- [53] M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **120** (2008) 2428 – 2431; *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008) 2394 – 2397.
- [54] S. A. Slavoff, I. Chen, Y. A. Choi, A. A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 1160 – 1162.
- [55] A. S. Raghavan, H. C. Hang, *Drug Discovery Today* **14** (2009) 178 – 184.

- [56] K. A. Stubbs, A. Scaffidi, A. W. Debowski, B. L. Mark, R. V. Stick, D. J. Vocadlo, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 327 – 335.
- [57] H. Ovaa, P. F. van Swieten, B. M. Kessler, M. A. Leeuwenburgh, E. Fiebigler, A. van den Nieuwendijk, P. J. Galardy, G. A. van der Marel, H. L. Ploegh, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem.* **115** (2003) 3754 – 3757; *Angew. Chem. Int. Ed.* **42** (2003) 3626 – 3629.
- [58] H. C. Hang, J. Loureiro, E. Spooner, A. W. M. van der Velden, Y. M. Kim, A. M. Pollington, R. Maehr, M. N. Starnbach, H. L. Ploegh, *ACS Chem. Biol.* **1** (2006) 713– 723.
- [59] T. Hosoya, T. Hiramatsu, T. Ikemoto, M. Nakanishi, H. Aoyama, A. Hosoya, T. Iwata, K. Maruyama, M. Endo, M. Suzuki, *Org. Biomol. Chem.* **2** (2004) 637 – 641.
- [60] M. Verdoes, B. I. Florea, U. Hillaert, L. I. Willems, W. A. van der Linden, M. Sae-Heng, D. V. Filippov, A. F. Kisselev, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *ChemBioChem* **9** (2008) 1735 – 1738.
- [61] G. Budin, M. Moune Dimala, V. Lamour, P. Oudet, C. Mioskowski, S. Meunier, L. Brino, A. Wagner, *ChemBioChem* **11** (2010) 79 – 82.
- [62] K. Tanaka, K. Minami, T. Tahara, E. R. O. Siwu, K. Koyama, S. Nozaki, H. Onoe, Y. Watanabe, K. Fukase, *J. Carbohydr. Chem.* **29** (2010) 118 – 132.
- [63] a) C. L. Stabler, X. L. Sun, W. Cui, J. T. Wilson, C. A. Haller, E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chem.* **18** (2007) 1713 – 1715; b) J. T. Wilson, C. A. Haller, Z. Qu, W. Cui, M. K. Urlam, E. L. Chaikof, *Acta Biomater.* **6** (2010) 1895 – 1903.
- [64] M. D. Resh, *Nat. Chem. Biol.* **2** (2006) 584 – 590.
- [65] S. M. Peseckis, I. Deichaite, M. D. Resh, *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 5107 – 5114.
- [66] H. C. Hang, E. J. Geutjes, G. Grotenbreg, A. M. Pollington, M. J. Bijlmakers, H. L. Ploegh, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 2744 – 2745.
- [67] M. A. Kostiuik, M. M. Corvi, B. O. Keller, G. Plummer, J. A. Prescher, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, G. Rajaiah, J. R. Falck, L. G. Berthiaume, *FASEB J.* **22** (2008) 721 – 732.
- [68] D. D. O. Martin, G. L. Vilas, J. A. Prescher, G. Rajaiah, J. R. Falck, C. R. Bertozzi, L. G. Berthiaume, *FASEB J.* **22** (2008) 797 – 806.
- [69] P. Griesß, *Philos. Trans. R. Soc. London* **13** (1864) 377.
- [70] a) E. F. V. Scriven, K. Turnbull, *Chem. Rev.* **88** (1988) 297 – 368; b) G. L'Abbé, *Chem. Rev.* **69** (1969) 345 – 363.
- [71] a) P. A. S. Smith, *Org. React.* **3** (1946) 337 – 349; b) J. H. Boyer, F. C. Canter, *Chem. Rev.* **54** (1954) 1 – 57.
- [72] T. S. Lin, W. H. Prusoff, *J. Med. Chem.* **21** (1978) 109 – 112.
- [73] Q. Liu, Y. Tor, *Org. Lett.* **5** (2003) 2571 – 2572.
- [74] a) P. B. Alper, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **37** (1996) 6029 – 6032; b) J. T. Lundquist, J. C. Pelletier, *Org. Lett.* **3** (2001) 781 – 783; c) W. S. Horne, C. S. Stout, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 9372 – 9376.
- [75] B. E. Blass, K. R. Coburn, A. L. Faulkner, W. L. Seibela, A. Srivastava, *Tetrahedron Lett.* **44** (2003) 2153 – 2155.
- [76] a) G. Righi, C. D'Achille, G. Pescatore, C. Bonini, *Tetrahedron Lett.* **44** (2003) 6999 – 7002; b) N. Halland, A. Braunton, S. Bachmann, M. Marigo, K. A. Jørgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 4790 – 4791.
- [77] S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44** (2005), 5188 – 5240.